

## **EXTRACTION OF ACTIVE INGREDIENT IN CELL**

Patent Number: JP63304990

Publication date: 1988-12-13

Inventor(s): TAKEBE HIDEAKI; others: 07

Applicant(s):: MEIJI SEIKA KAISHA LTD; others: 01

Requested Patent: JP63304990

Application Number: JP19870140461 19870604

Priority Number(s):

IPC Classification: C12P1/02 ; C12N9/42 ; C12P1/00 ; C12P7/64

EC Classification:

Equivalents: JP1876088C, JP5087236B

### **Abstract**

**PURPOSE:** To efficiently extract an active ingredient in cells from a mold containing chitosan in a cell wall, by using chitosanase, a cell wall dissolving enzyme.

**CONSTITUTION:** A mold belonging to the order Mucorales or Moriliiales is cultivated in an agar medium to form a spore, which is transplanted to a liquid medium and the mold is multiplied to accumulate an active ingredient in the cell. The prepared cell is directly dispersed in an aqueous solution or a buffer solution or washed and dispersed, mixed with a cell wall dissolving enzyme containing chitosanase derived from *Bacillus pumilus* BN-262 (FERM P-8814) and slowly shaken at 30-40 deg.C for 6-8hr to extract the active ingredient. beta-1,3- Glucanase, cellulase or chitinase may be used as the cell wall dissolving enzyme except chitosanase.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報 (A) 昭63-304990

⑬ Int.Cl.

C 12 P 1/02  
C 12 N 9/42  
C 12 P 1/00

識別記号

府内整理番号  
Z-6807-4B  
8828-4B  
A-6807-4B

⑭ 公開 昭和63年(1988)12月13日

※審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 菌体内有効成分の抽出方法

⑯ 特願 昭62-140461

⑰ 出願 昭62(1987)6月4日

特許法第30条第1項適用 昭和62年3月10日 社団法人日本農芸化学会発行の「昭和62年度日本農芸化学会大会講演要旨集」に免表

⑱ 発明者 武部 英日 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製薬株式会社薬品開発研究所内

⑲ 発明者 松信 俊男 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製薬株式会社薬品開発研究所内

⑳ 出願人 明治製薬株式会社 東京都中央区京橋2丁目4番16号

㉑ 代理人 弁理士 久保田 藤郎

㉒ 出願人 工業技術院長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

㉓ 復代理人 弁理士 久保田 藤郎

最終頁に続く

## 明月 春田 宏

## 1. 発明の名称

菌体内有効成分の抽出方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 細胞壁にキトサンを有する糸状菌より菌体内有効成分を抽出するに際し、細胞壁溶解酵素キトナーゼを使用することを特徴とする菌体内有効成分の抽出方法。

(2) 細胞壁にキトサンを有する糸状菌がムコラレス (Mucorales) 目またはモリリアレス (Mortillales) 目に属するものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) キトナーゼがバチルス・バキルス (*Bacillus* *paniicus*) 8M-262 (FERM P-8814) の生産するものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 〔産業上の利用分野〕

本発明は菌体内有効成分の抽出方法に関し、詳しくはキトナーゼを使用して糸状菌より菌体内有効成分を抽出する方法に関する。

糸状菌は酵母と共に発酵法による食品、医薬品等の製造に古くから利用されているが、糸状菌を生育させて菌体内に各種の有効成分を生産せしめる技術の開発と相俟って、これら糸状菌より有効成分を効率よく抽出する方法が益々求められる傾向にある。

## 〔従来の技術〕

糸状菌より菌体内有効成分を抽出する前処理としての細胞壁の破砕、溶解に関しては化学的方法、物理的方法および酵素的方法 (特開昭60-75281、昭60-164477、昭61-7318号公報) が知られている。

## 〔発明が解決しようとする問題点〕

しかしながら、糸状菌は大腸菌などの細菌と異なり堅固な細胞壁を有するため、これを破砕、溶解することは容易でない。

そのため、従来より提案されている高熱処理、強酸・強アルカリ処理、溶剤処理等による細胞壁の分解や超音波処理、機械的処理 (ポールミル、モジナイザー、パンダムミルなど) 等の細胞壁

の破碎法は、細胞壁の分解、破碎が十分でなかつたり、また必然的に菌体内有効成分の消耗破壊を免れ得ないものであった。

このような状況下、酵素を使用して細胞壁を分解する方法が注目を集めている。糸状菌細胞壁の溶解に関与する酵素としては各種微生物起源のものが知られているが、これらの酵素は必ずしも満足しうるものとは云い難い。特に細胞壁にキトサンを有する糸状菌よりの菌体内有効成分の抽出に際しては、市販のセルラーゼ、キチナーゼ、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ等の細胞壁溶解酵素を用いた場合、抽出が効率よく行われず、糸状菌の菌体内有効成分の利用に大きな障害となっていた。

本発明は、細胞壁溶解酵素キトサナーゼを用いて効率よく糸状菌の菌体内有効成分を抽出する方法に関する。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、糸状菌の菌体内有効成分を効率よく抽出する方法について検討を重ねた結果、細胞壁溶解酵素キトサナーゼを使用することによつ

て温和な条件で菌体内有効成分の消耗破壊を招くことなく、効率よく抽出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、細胞壁にキトサンを有する糸状菌より菌体内有効成分を抽出するに際し、細胞壁溶解酵素キトサナーゼを使用することを特徴とする菌体内有効成分の抽出方法に関する。

本発明に用いるキトサナーゼとしてはその起源を問わず、キトサナーゼを生産する微生物に由来するものが任意に使用できる。また、これら微生物の変種もしくは変異株を起源とするものであつてもよい。たとえば特願昭61-207780号明細書に記載のキトサナーゼがある。キトサナーゼとしては該酵素生産菌の培養液あるいはその培養液を使用してもよく、さらには該液を硝安培折後透析したもの、あるいはエタノール、アセトン等の溶媒を添加して得られた粗酵素粉末、該粉末を水または緩衝液に溶解したもの、ゲル濃過法、イオン交換法等により分離された活性区分など種々の形態のものを使用することができる。

次に、糸状菌としては細胞壁にキトサンを有するものであればよく、たとえばムコラレス(*Mucorales*)目に属する糸状菌があり、具体的にはリゾーブス属、ムコール属、モルティエレラ属等に属する糸状菌およびモリリアレス(*Moriliaceae*)目に属する糸状菌、たとえばトリコデルマ属に属する糸状菌が挙げられる。

本発明を実施するにあたり、まず糸状菌を適当な培地、たとえば菌体培地(寒天培地)上培養して胞子を形成させ、この胞子を液体培地に移植し、菌体を増殖させ、菌体内に食品、医薬品等の分野において有用な有効成分を蓄積せしめる。得られた菌体をそのまま、あるいは洗浄したのち水溶液または緩衝液に懸濁し、これに予め調製したキトサナーゼを含む細胞壁溶解酵素を任意の順序で添加し、25~45℃、好ましくは30~40℃で4~12時間、好ましくは6~8時間ゆるやかに振とうする。ここで、キトサナーゼ以外の細胞壁溶解酵素としては既知のものを任意に使用でき、たとえば $\beta$ -1,3-グルカナーゼ、セルラーゼ、

キチナーゼ等の酵素を単独でもしくは2種以上組合せてキトサナーゼと共に使用することができる。なお、これら酵素についても、その起源は限らない。

(実施例)

次に、本発明を実施例により説明するが、これらは本発明の範囲を何ら制限するものではない。

実施例1

モルティエレラ・イサベリナ(*Mortierella isabericina*)IFO 8187をM Y寒天培地(酵母エキス3g、ポリペプトン5g、瓈芽エキス3g、グルコース10g、水1Lおよび寒天20gからなる)上において、25℃で1週間培養し胞子を形成させた。これに生理食塩水を加えて胞子懸濁液を調製し、この胞子懸濁液を水1L当たりグルコース200g、尿素6g、 $K_2HPO_4$  9g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1g、 $NaCl$  0.3g、瓈芽エキス0.6g、酵母エキス0.6g、ペプトン0.3g、 $PbSO_4 \cdot 7H_2O$  0.03g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.004g、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.0006g、

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.003 g,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.003 g, pH 5.5 からなる液体培地に移植し、30℃で5日間恒温気瓶培養させ、固体内にテリノレン酸を含む油脂を蓄積させた。

次いで、この培養プロセスから2回遠心・洗浄(0.2M酢酸バッファー)を経過し、湿菌体を得た。この湿菌体1gを0.2M酢酸バッファー(pH 5.6)5000 rpmに懸濁し、バチルス・バミルス BN-262(FERM P-8814)の生産するキトサナーゼ粗酵素粉末(特開昭61-207780) ( $8 \times 10^4$  U)を加え35℃で7時間ゆるやかに攪拌を行なった。反応終了後、吸引過濾により固体を分離し、真空下40℃で12時間乾燥を行なった。この乾燥菌体にローヘキサン2500 mlを加え、室温で3時間攪拌を行ない固体よりローヘキサンへ油脂抽出を行なった。さらに、このローヘキサン溶液を減圧濃縮し1.5 gのテリノレン酸含有油脂を得た。

比較例として、同様の方法で市販の細胞壁溶解酵素セルラーゼ( $1.6 \times 10^4$  U), キチナーゼ(シグマ社製) ( $4 \times 10^4$  U)およびターグルクロニ

ダーゼ(シグマ社製) ( $4 \times 10^4$  U)を混用添加した場合、テリノレン酸含有油脂の収率は6.3 gであり、セルラーゼ( $1.6 \times 10^4$  U)とターグルクロニダーゼ( $4 \times 10^4$  U)を混用添加した場合は4.8 gであり、全く酵素を加えない場合は3.5 gであった(第1表参照)。

#### 実施例2

実施例1と同様の方法でキトサナーゼ( $4 \times 10^4$  U)とキチナーゼ(シグマ社製) ( $4 \times 10^4$  U)との併用の場合は1.24 gのテリノレン酸含有油脂を得た。

本実施例に用いたキトサナーゼ粗酵素粉末の調製法は下記のように実施した。バチルス・バミルス BN-262(FERM P-8814)の培養液を遠心分離(6000 rpm)して固体を除去し、培養上澄液を得た。これに8.0%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、生じた脂質沈殿物をセロファンチューブで充分透析後、凍結乾燥して粗酵素粉末を得た。

#### 実施例3

実施例2と同様の方法であるが、用いた菌体は洗浄を行なわず、また0.2M酢酸バッファーは用いず水に懸濁して反応処理を実施した。その結果、得られたテリノレン酸含有油脂量は1.21.5 gであった。

#### 【発明の結果】

本発明によれば、細胞壁にキトサンを有する糸状菌より菌体内有効成分を効率よく簡単に抽出することができる。したがって、本発明の方法は食品、医薬品等として有用な物質の製造に広く利用できる。

第1表

テリノレン酸含有油脂(g)	3.5	4.8	6.3	1.05	1.21.5
方 法	従来法	従来法	従来法	本発明法	本発明法
添加剤	セルラーゼ、ターグルクロニダーゼ( $1.6 \times 10^4$ U)	セルラーゼ、ターグルクロニダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ( $4 \times 10^4$ U)	セルラーゼ、ターグルクロニダーゼ( $1.6 \times 10^4$ U)	キトサナーゼ( $8 \times 10^4$ U)	キトサナーゼ、キチナーゼ( $4 \times 10^4$ U)
結果					

特許出願人 明治製薬株式会社

工業技術院長

代理人弁護士 久保田 駿郎



## 第1頁の続き

⑥Int.Cl. 1	識別記号	厅内整理番号
C 12 P 7/64		7236-4B
)(C 12 P 1/02		
C 12 R 1/645)		
(C 12 N 9/42		
C 12 R 1/07)		
(C 12 P 1/00		
C 12 R 1/07)		
⑦発明者 佐藤 篤行 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製薬株式会社薬品開発研究所内		
⑦発明者 蛭田 修 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製薬株式会社薬品開発研究所内		
⑦発明者 魚谷 和道 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製薬株式会社薬品開発研究所内		
⑦発明者 中川 幸二 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製薬株式会社薬品開発研究所内		
⑦発明者 渡辺 宰男 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製薬株式会社薬品開発研究所内		
⑦発明者 深津 俊三 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製薬株式会社薬品開発研究所内		